绿盲蝽磷脂酶 C(AlPLC)的表达、纯化及酶学性质

谭永安[1], 赵旭东[2,3], 郝德君[2,3], 肖留斌[1,*], 柏立新[1], 赵 静[1], 孙 洋[1], 姜义平[1]

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 3. 南京林业大学林学院, 南京 210037)

摘要:【目的】本文在前期获得绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 磷脂酶 C 基因(*AlPLC*)的基础上,明晰 *AlPLC* 基因在绿盲蝽不同日龄若虫中的表达特征,阐明 *AlPLC* 重组蛋白的酶学性质。【方法】qRT-PCR 法分析 1 – 13 日龄绿盲蝽若虫 *AlPLC* 的表达量;构建含有 *AlPLC* 基因的原核表达载体 pCzn1-*AlPLC*;进一步将该表达载体经 IPTG 诱导表达和蛋白纯化,获得具有磷脂酶活性的重组蛋白;以 *p*-NPPC(P-硝基苯基磷酸胆碱)为底物测定不同温度和不同 pH 下的重组 AlPLC 蛋白酶活性,最终确定了其酶活性的最佳 pH 和最适温度。【结果】*AlPLC* mRNA 在绿盲蝽测定的若虫期持续表达,在 4, 8, 12 以及 13 日龄若虫中表达量相对较高。重组蛋白 AlPLC 可在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达一个约 79 kD 的蛋白,12% SDS-PAGE 显示该蛋白主要以包涵体形式存在;经过变性,复性获得具有磷脂酶活性的纯化蛋白。在蛋白浓度为 0.25 mg/mL 条件下,该酶最适温度为 57℃(179.54 ± 3.96 nmol/μg · min),最适 pH 为 8.5(374.99 ± 2.84 nmol/μg · min)。【结论】结果表明 *AlPLC* 在绿盲蝽若虫中表达具有特异的发育历期特性,获得的重组蛋白在较高温度和碱性环境下有较高磷脂酶活性。本研究结果为后续在蛋白水平上解析 AlPLC 的功能奠定基础。

关键词: 绿盲蝽; 磷脂酶 C; 原核表达; 蛋白纯化; 酶学特性; 酶活性

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2017)11-1247-08

Expression, purification and enzymatic characteristics of phosphodiesterase C (AlPLC) of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

TAN Yong-An[1], ZHAO Xu-Dong[2,3], HAO De-Jun[2,3], XIAO Liu-Bin[1,*], BAI Li-Xin[1], ZHAO Jing[1], SUN Yang[1], JIANG Yi-Ping[1] (1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract:【Aim】Based on our previous work of cloning the phospholipase C gene *AlPLC* from *Apolygus lucorum*, this study aims to determine the expression profiles of *AlPLC* gene in different day-old nymphs of *A. lucorum*, to obtain the recombinant protein which has the phospholipase enzyme activity and to clarify its enzymatic characteristics.【Methods】Using the qRT-PCR technique, we determined the

基金项目: 棉花化肥农药减施技术集成与示范(2017YFD0201900); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-15-18); 国家自然科学基金项目(31301668); 转基因棉花环境安全性评价技术(2016ZX08011); 江苏省农业科学院院基金(611613)

作者简介: 谭永安, 男, 1982 年 9 月生, 江苏江都人, 博士, 副研究员, 研究方向为昆虫生理与分子生物学, E-mail: kellytan001@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xlbwll@163.com

收稿日期 Received: 2017-08-08; 接受日期 Accepted: 2017-10-23

expression pattern of *AlPLC* in one day-old to 13 day-old nymphs of *A. lucorum*. The recombinant plasmid containing target gene was specifically expressed after induction by IPTG. The recombinant protein was purified by GST agarose affinity chromatography and molecular sieve chromatography. Then the enzymatic characteristics of this recombinant protein under different temperatures and pH were measured by *p*-nitrophenylphosphorylcholine (*p*-NPPC). Finally, the optimum temperature and pH for the enzyme activity of PLC were analyzed. 【Results】*AlPLC* was found to be continuously expressed throughout the surveyed nymphal stage of *A. lucorum*, and highly expressed in 4, 8, 12 and 13 day-old nymphs. The recombinant plasmid pCzn1-*AlPLC* expressed the target recombinant protein of 79 kD after IPTG induction in *Escherichia coli*. The 12% SDS-PAGE showed that the recombinant protein was mainly present as inclusion bodies. The purified protein of AlPLC with the phosphodiesterase activity was obtained after denaturation and renaturation. This recombinant protein had higher phospholipase activity by using *p*-NPPC as substrates, and under the protein concentration of 0.25 mg/mL, the most suitable temperature for its reaction was 57℃ (179.54 ± 3.96 nmol/μg · min) and the optimal pH was 8.5 (374.99 ± 2.84 nmol/μg · min). 【Conclusion】The expression of *AlPLC* shows the developmental stage-specificity. Higher enzyme activity of AlPLC can be achieved under higher temperature and alkaline environment. The results provide the basis for analyzing the AlPLC function at the protein level.

Key words: *Apolygus lucorum*; phospholipase C; prokaryotic expression; protein purification; enzymatic characteristics; enzyme activity

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 具有寄主广泛、食性杂、繁殖速度快、行动敏捷及天敌控制作用弱等特点(陆宴辉和吴孔明, 2008)。此外,寄主作物的多样化、充足的营养条件以及良好的越冬环境对绿盲蝽生长繁殖和越冬存活非常有利(Lu *et al.*, 2010)。从 20 世纪 90 年代我国商业化种植转苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)棉花开始,棉田主要鳞翅目害虫的危害得到了有效的控制,但也使得棉田害虫的生态位发生了一系列演替,长期作为次要害虫的绿盲蝽等刺吸害虫种群数量剧增,危害增强并呈严重灾变趋势(Wu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010)。生产上对化学农药的长期依赖势必会导致绿盲蝽的抗药性日渐增强,从而造成防效下降(Lu *et al.*, 2012)。同时,化学农药的长期使用也会导致环境污染、食品安全等问题,危及到人类的健康,因此对绿盲蝽等盲蝽科植食性害虫亟需新的防治手段。

磷酸肌醇代谢是在细胞内信号系统中十分重要,它参与调节多种细胞信号和功能,包括激素和神经递质的信号转导、生长因子介导信号、细胞形态和细胞分裂等(Janetopoulos and Devreotes, 2006)。磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)是这一系统中关键的酶。PLC 是磷脂酶基因家族中的一员,根据水解的底物不同可以将其分为磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) 和非特异性的磷脂酶 C (non-specific phospholipase, NPC) (Kocourkova *et al.*, 2011)。研究发现,激素、多肽生长因子、神经递质、抗原等多种胞外信号分子与细胞表面相应受体结合后可激活 PI-PLC 水解质膜上 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)生成 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)和二酰基甘油(DAG)两个第二信使(Rupwate and Rajasekharan, 2012), IP_3 和 DAG 参与细胞增殖、早期发育、细胞分化、分泌、收缩等许多生物化学反应的调节(Kadamur and Ross, 2013; 李文楚和徐亚玲 2014)。在哺乳动物中,IP_3 激活钙离子通道,从而让钙离子流入细胞内,而 DAG 则使蛋白激酶 C 被激活(Nishizuka, 1992; Berridge, 2009)。此外,20-羟基蜕皮素(20-hydroxyecdysone, 20E)同时也可以通过 GPCR-PLC-IP_3-Ca^{2+}-PKC 途径调控家蚕丝腺的程序性死亡(Iga *et al.*, 2007; Manaboon *et al.*, 2009)。近年来的研究表明,20E 可通过 GPCR-PLC-Ca^{2+}途径诱导 CDK10 的快速磷酸化,促进基因转录(Liu *et al.*, 2014a)。同时,JH 也可以激活 PLC 通道通过 *Met* 来促进基因的转录(Liu *et al.*, 2015)。因此,PLC 在昆虫生长发育及及蜕皮变态过程中起着关键的作用。在本实验室前期的研究已经通过克隆获得绿盲蝽磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C 基因(*AlPLC*)的 cDNA 全长(GenBank 登录号: MF577058)的基础上,本研究测定了该基因在绿盲蝽不同日龄若虫

中的表达情况；并在原核细胞中高效表达获得具有磷脂酶活性的重组蛋白，应用酶学方法进一步对其酶学特性进行分析。本研究结果可为揭示 AlPLC 的功能及丰富昆虫蜕皮激素信号传导的网络构建奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试虫

初始绿盲蝽于 2016 年采自江苏沿海棉区的大丰市蚕豆田(33.11°N，120.25°E)，室内用新鲜四季豆 *Phaseolus vulgaris* 续代饲养，饲养条件：温度 27 ±0.5 ℃，相对湿度 70% ±5%，光周期 14L∶10D。

1.2　主要供试试剂及仪器

RNA 提取试剂盒(Promega)、M-MLV 反转录试剂盒(Promega)、pCzn1 质粒、TOP10 菌株、大肠杆菌 *Escherichia coli* Arctic express 菌株均为实验室前期保存；卡那霉素、咪唑、尿素为上海生工工程生物公司产品；限制性内切酶(TaKaRa)，Pfu DNA 聚合酶(Zoonbio)，Protein Marker(Thermo)，IPTG，Acr，Bis，Tris(Sigma)，*p*-NPPC(上海麦克林公司) SDS(Amresco)，TEMED(BIO-RAD)，高糖，DMEM 培养基(Gibco)，Tyrptone，Yeast Extract(OXOID)，Agarose(上海基因公司)；其他试剂均为国产分析纯。Ni^{2+} IDA 亲和层析胶(Novagen)，HexIOS 分光光度计，Allegra 21R 台式高速冷冻离心机(Beckman)，台式高速离心机(Sorval)，Biologic LP 层析系统，Mini Protean Ⅱ垂直平板电泳系统，水平电泳系统(BIO-RAD)，PTC-200 基因扩增仪(MJ Research)。

1.3　绿盲蝽总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

以初孵 1 龄若虫记为 1 日龄若虫，随后采集绿盲蝽 2 -14 日龄若虫，提取总 RNA，每个样本 15 头为一组，3 个生物学重复。选择电泳图谱良好并且 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8 ~2.0 的总 RNA 样品一同进行 mRNA 的纯化，M-MLV 反转录试剂盒合成 cDNA。根据前期研究结果，在上述饲养条件下，1 -5 龄绿盲蝽若虫发育历期分别为 2，2，2，3 和 3 d(赵洪霞等，2011)。

1.4　实时荧光定量 PCR

本研究所用的 *AlPLC*(GenBank 登录号：MF577058)引物依据前期克隆得到的基因序列设计，并以绿盲蝽持家基因 *β-actin* 为内标基因(GenBank 登录号：JN616391)，引物设计运用 Primer 5.0 软件由生工生物工程上海合成部合成，引物序列见表 1，扩增体系：UltraSYBR mix 12.5 μL，上下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH_2O 9.5 μL，25 μL 体系；扩增条件：原始预变性 95℃ 2 min，95℃ 15 s，49℃ 20 s，72℃ 20 s，循环 45 次。每个样品设置 3 个独立的生物学重复，每个生物学重复设置 3 个技术重复。

表 1　研究中使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences
AlPLC-F	GCTCCTAAGCCTGAACCTGA
AlPLC-R	ACCATTGAAGAAAGCCAAGG
Al-β-Actin-F	ACCTGTACGCCAACACCGT
Al-β-Actin-R	TGGAGAGAGAGGCGAGGAT

1.5　表达载体的构建

Nde Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 双酶切含有 *AlPLC* 的 T 载体，DNA Fragment Purification Kit 回收酶切产物，用 T4 DNA 连接酶连接同样经过双酶切并回收的 pCzn1 载体，获得含有目的片段的重组质粒 pCzn1-*AlPLC*，对其进行测序鉴定。

1.6　融合蛋白的原核诱导表达

将测序正确的 pCzn1-*AlPLC* 重组质粒 1 μL 加入 100 μL 感受态细菌中，置冰上 20 min。42℃热激 90 s，迅速置冰中 5 min 加入 600 μL LB 培养液，37℃ 220 r/min 振摇 1 h，离心后全部涂布于含 50 μg/mL Amp 的 LB 平板，37℃倒置培养过夜。挑取转化平板上的单克隆接种于含 50 μg/mL AMP 的 3 mL LB 培养液的试管中，37℃ 220 r/min 振摇过夜；次日按体积比 1∶100 接种于 50 μg/mL AMP 的 30 mL LB 培养液中，37℃ 220 r/min 振摇至菌体 OD_{600} 为 0.6 ~0.8 再取出 1 mL 培养物，10 000 ×g 室温离心 2 min，弃上清，用 100 mL 1 × 上样缓冲液重悬菌体沉淀，向剩余的培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L，11℃ 220 r/min 振摇过夜，诱导融合蛋白表达；之后取出 1 mL 培养物，10 000 ×g 室温离心 2 min，弃上清，用 100 μL 1 × 上样缓冲液重悬菌体沉淀。剩余培养物 4 000 ×g，离心 10 min，弃上清，用 PBS 重悬菌体沉淀；重悬液进行超声波破碎后，分别取上清液与沉淀液加入上样缓冲液重悬进行 12% SDS-PAGE 检测分析，考马斯亮蓝染色显带。以不加 IPTG 作为对照。

1.7 融合蛋白的变复性

先将菌体沉淀重悬于 20 mL lysis buffer，超声破碎（功率 400 W，工作 4 s，间歇 8 s，共 20 min），将超声破碎的细胞裂解液 4℃ 10 000 × g 离心 20 min，收集沉淀；再用包涵体洗涤液（20 mmol/L Tris，1 mmol/L EDTA，2 mol/L 尿素，1 mol/L NaCl，1% Triton X-100，pH 8.0）洗涤包涵体 3 次，用溶解缓冲液（20 mmol/L Tris，5 mmol/L DTT，8 mol/L 尿素 pH 8.0）按一定比例溶解包涵体，4℃ 放置过夜；室温，15 000 r/min 离心 15 min；之后将上述溶液滴加 20 mmol/L Tris-HCl，100 mmol/L NaCl Buffer pH 8.0 缓冲液中，逐步成倍梯度稀释缓慢搅拌，将蛋白溶液装入透析袋于 20 mmol/L Tris-HCl，100 mmol/L NaCl，pH 8.0 溶液中透析过夜。

1.8 融合蛋白的 Ni 柱亲和纯化

利用低压层析系统，包涵体溶液以 0.5 mL/min 流速上样至 Ni-IDA Binding-Buffer 预平衡的 Ni-IDA-Sepharose CL-6B 亲和层析柱，用 Ni-IDA Binding-Buffer 以 0.5 mL/min 流速冲洗，至流出液 OD_{280} 值到达基线，再用 Ni-IDA Washing-Buffer（20 mmol/L Tris-HCl，20 mmol/L 咪唑，0.15 mol/L NaCl，pH 8.0）以 1 mL/min 流速冲洗，至流出液 OD_{280} 值到达基线；用 Ni-IDA Elution-Buffer（20 mmol/L Tris-HCl，250 mmol/L 咪唑，0.15 mol/L NaCl，pH8.0）以 1 mL/min 流速洗脱目的蛋白，收集流出液；上述收集的蛋白溶液加入透析袋中，使用 20 mmol/L Tris-HCl，0.10 mol/L NaCl，pH 8.0 进行透析过夜；进行 12% SDS-PAGE 分析，最后用 BCA 蛋白定量试剂盒（天根生化科技有限公司）测定蛋白浓度。

1.9 重组 AlPLC 蛋白的酶学特性分析

以对硝基苯基磷酰胆碱（*p*-NPPC）为底物，参照 Wieland 方法并稍有改进（Wieland *et al*., 2002）。反应体系：0.25 mol/L Tris-HCl（pH 7.2）缓冲液，60% 山梨醇（w/v），10 mmol/L p-NPPC，20 μL 酶液（0.25 mg/mL），200 μL 体积的反应溶液于 37℃ 反应 30 min，最后定容至 6 mL，立即在 410 nm 下测定吸光值，以不加酶液的反应体系作为对照。酶活性单位定义：在 pH 7.2，温度为 37℃ 下，每分钟水解 *p*-NPPC 生成 1 mmol/L 对硝基苯酚需要的酶量为 1 个酶活性单位，靶蛋白酶活性以 nmol/μg · min 表示。

不同温度下重组 AlPLC 蛋白酶活性测定：将反应体系分别置于 17，27，37，47，57，67，77 和 87℃ 下反应 30 min，按照上述方法测定酶活性。

不同 pH 下重组 AlPLC 蛋白酶活性测定：将上述反应体系 Tris-HCl（pH 7.2）缓冲液替换成不同 pH 梯度（pH 4.5，5.0，5.5 和 6.0 为 0.25 mol/L $C_5H_7O_5COOH$-$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$；pH 6.5，7.0 和 7.5 为 0.25 mol/L KH_2PO_4-$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 缓冲液；pH 8.0，8.5，9.0 和 9.5 为 0.25 mol/L Tris-HCl 缓冲液），于 37℃ 反应 30 min，按照上述方法测定酶活性。

1.10 数据分析

不同处理的绿盲蝽 *AlPLC* 基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$（Livak and Schmittgen, 2001）计算。差异显著性采用统计软件 SAS 8.0 中的 Duncan 氏新复极差法进行分析。

2 结果

2.1 *AlPLC* 基因在绿盲蝽不同日龄若虫中的表达量变化

结果表明（图 1），*AlPLC* 在 4，8，12 和 13 日龄绿盲蝽中的表达量相对较高，并在 12 和 13 日龄时表达量最高，且与其他日龄的表达量差异显著（$P < 0.05$）。结合绿盲蝽生物学特性，绿盲蝽 4 日龄若虫处于 2 龄蜕皮期，8 日龄若虫处于 4 龄蜕皮期，12 与 13 日龄绿盲蝽处于羽化期，上述结果暗示着 *AlPLC* 可能参与了绿盲蝽的生长发育和蜕皮过程。

2.2 重组 AlPLC 的表达、复性及纯化

重组质粒命名为 pCzn1-*AlPLC*（图 2：A）。随后将其转化至大肠杆菌 Arctic Express 表达菌株中，经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 12 h 后，用 12% SDS-PAGE 检测分析发现，pCzn1-*AlPLC* 重组质粒表达一个约 79 kD 的蛋白，与理论大小相符（图 2：B）。而不经 IPTG 诱导的重组质粒无此蛋白表达，说明 *AlPLC* 基因已在大肠杆菌细胞中诱导表达。但诱导表达的 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白均分布在沉淀体中，上清液中几乎没有，说明 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白主要以包涵体形式存在。包涵体经体外溶解、复性后，利用 SDS-PAGE 电泳分析 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白的纯化情况。用含 20 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱后包涵体纯度有较大程度的提高，进一步复性和纯化后在 79 kD 附近仅出现一条明显的特异性条带未见其他条带，说明已得到纯化的靶蛋白（图 3）。采用蛋白定量试剂盒测定该蛋白的浓度为 0.25 mg/mL，可以继续进行重组蛋白 AlPLC 的酶学性质的分析工作。

2.3 重组蛋白 AlPLC 磷脂酶活性的检测

为证实获得的重组蛋白 AlPLC 具有磷脂酶的

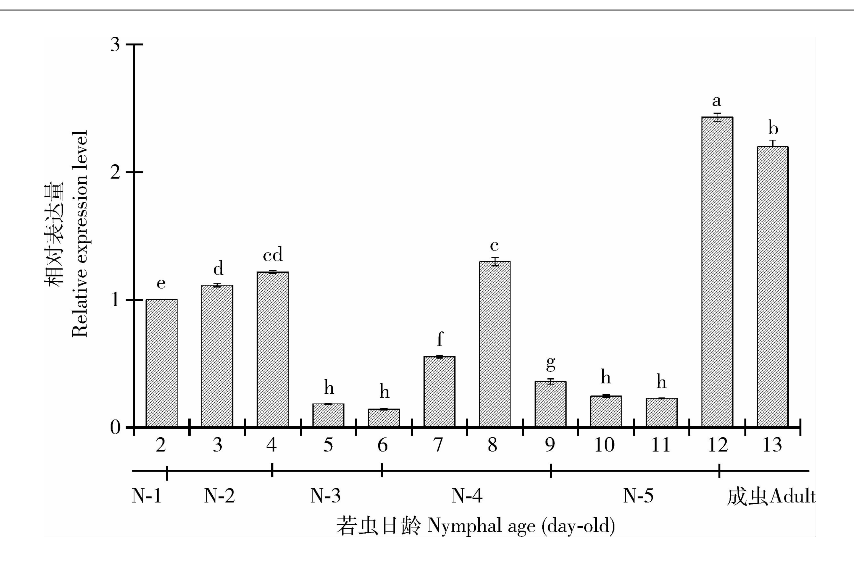


图 1　*AlPLC* 在绿盲蝽不同日龄若虫中的相对表达量

Fig. 1　The relative expression levels of *AlPLC* at different age in *Aploygus lucorum* nymphs

图中 N-n 表示若虫不同龄期；数据为平均数 ± 标准误，柱上不同字母表示差异达显著水平（$P < 0.05$，Duncan 氏多重比较）。N-n represents nymphs in different instars. Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple comparison).

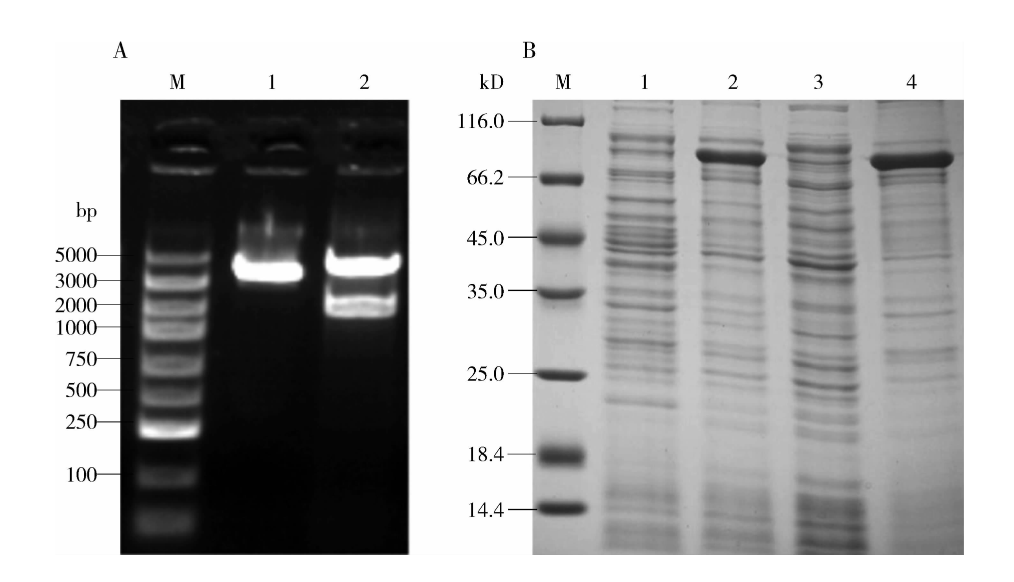


图 2　原核表达质粒 pCzn1-*AlPLC* 双酶切 PCR(A) 及 IPTG 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析(B)

Fig. 2　PCR of the recombinant plasmid after restriction digestion (A) and expression SDS-PAGE analysis induced by IPTG (B) of pCzn1-*AlPLC*

A：M：DL5000；1：酶切前质粒 Plasmid before restriction digestion；2：酶切后质粒 Plasmid after restriction digestion. B：M：蛋白分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：未经 IPTG 诱导的 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白 pCzn1-*AlPLC* expressed protein without induced by 0.5 mmol/L IPTG；2：IPTG 诱导的 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白 pCzn1-*AlPLC* expressed protein induced by 0.5 mmol/L IPTG；3：重组质粒 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白上清 Supernatant of pCzn1-*AlPLC* expressed protein induced by 0.5 mmol/L IPTG；4：重组质粒 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白沉淀 Precipitate of pCzn1-*AlPLC* expressed protein induced by 0.5 mmol/L IPTG.

活性，以 *p*-NPPC 为底物，在 37℃ pH 7.2 的条件下测定了重组蛋白 AlPLC 在反应液中的酶活性。以不加底物为对照并调零分光光度计，重组蛋白 AlPLC 酶活性为 79.54 ± 2.83 nmol/μg · min，显著高于对照，表明获得的重组蛋白 AlPLC 具有典型的磷脂酶活性。

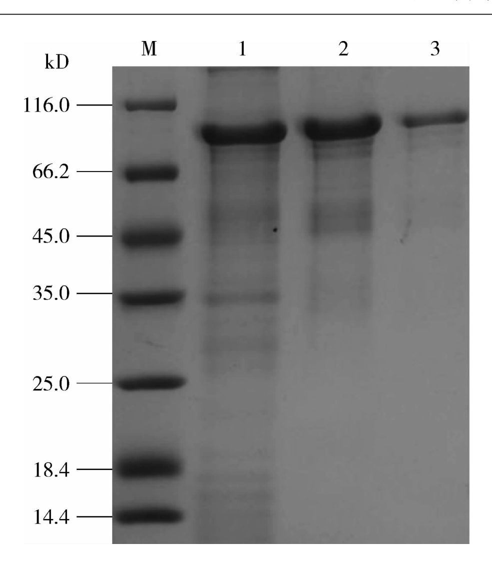


图 3 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of purified pCzn1-*AlPLC* fusion protein

M：蛋白分子量标准物 Protein marker；1：未纯化的 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白 Un-purified pCzn1-*AlPLC* expressed protein；2：洗脱中的 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白 Expressed pCzn1-*AlPLC* protein with flowing through；3：纯化后的 pCzn1-*AlPLC* 表达蛋白 Expressed pCzn1-*AlPLC* protein with purification.

2.4 不同温度下重组蛋白 AlPLC 的酶活性测定

在 pH 值为 7.2 的条件下，分析不同温度条件下重组蛋白 AlPLC 的磷脂酶活性的变化趋势。由图 4(A)可以看出，重组 AlPLC 蛋白的磷脂酶活性随着温度的上升呈现出先上升后下降的趋势，在温度过高(87℃)或者过低(17℃)时，重组 AlPLC 蛋白酶活性都相对较低，而在 57℃时，重组 AlPLC 蛋白酶活性最高(179.54 ± 3.96 nmol/μg · min)。

2.5 不同 pH 下重组 AlPLC 蛋白的酶活测定

分别配置不同 pH 的底物反应液，测定重组 AlPLC 蛋白在不同 pH 环境下的酶活性。结果表明(图 4：B)，当反应体系为 pH 8.5 时，重组 AlPLC 蛋白活性最高(374.99 ± 2.84 nmol/μg · min)，且碱性环境下酶活性显著高于酸性和中性，说明重组 AlPLC 蛋白是一个在碱性环境有较高活性的磷脂酶。

3 讨论

PLC 信号途径是发现最早、研究最为清楚的一条磷脂分子信号途径，该信号广泛存在于真核生物中。在该信号途径中，胞外信号激活质膜 PLC 活性，PLC 水解 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)产生 IP_3 和 DAG 两个胞内的第二信使，所以又称为双信使信号途径。其中 IP_3 可以激活胞内的 Ca^{2+} 库；而 DAG 继续留在质膜上，PKC(蛋白激酶 C)在钙离子作用下和质膜结合后，被 DAG 激活，进而磷酸化下游靶蛋白，引起相应的细胞应答反应(Rossse *et al.*, 2010)。在昆虫中，20E 会诱导 PLC 高表达，并使 PLC 向细胞膜迁移，对 PLC 进行基因沉默之后，也出现了幼虫死亡和化蛹缺陷的现象(Liu *et al.*, 2014a)。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中，外源 20E 通过激活 PLC-γ1 信号通路，诱导其自身发生酪氨酸磷酸化，从而调控 PLC-γ1 向细胞膜移动，并使 IP_3 和 DAG 的含量大量富集，改变细胞质内的钙离子浓度，影响棉铃虫的生长发育(Liu *et al.*, 2014b)。也有研究表明，20E 可通 GPCR-PLC-Ca^{2+} 途径诱导周期蛋白依赖的激酶 10(CDK10)的快速磷酸化，促

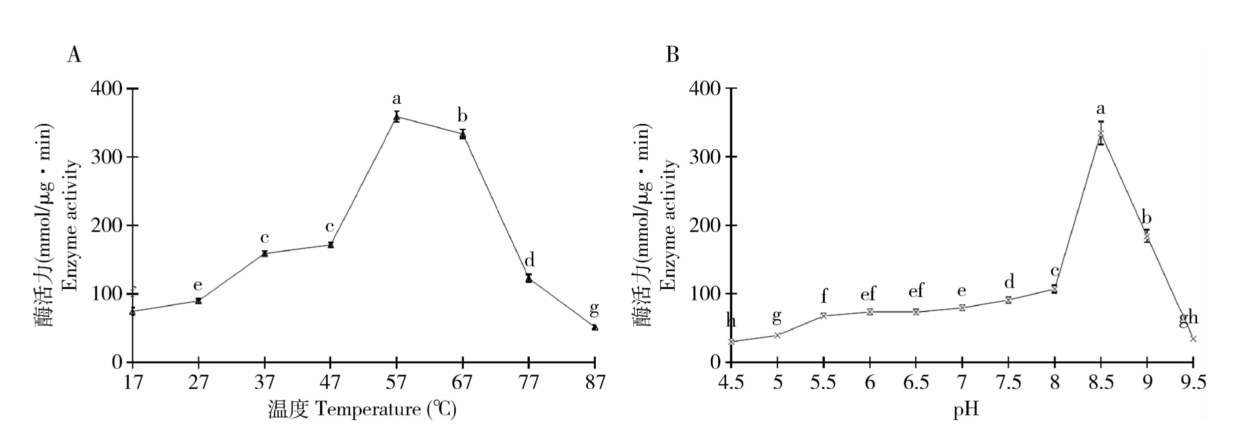


图 4 不同温度(A)及不同 pH(B)对 AlPLC 蛋白酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different temperature (A) and pH (B) on AlPLC enzyme activity

图中数据为平均数 ± 标准误，柱上不同字母表示差异达显著水平($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较)。Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple comparison).

进基因转录(Liu *et al*., 2014a)。本实验在前期克隆 *AlPLC* 的基础上,对绿盲蝽不同日龄若虫的 *AlPLC* 表达量进行了研究,发现 *AlPLC* 基因在的 4, 8 和 12 及 13 日龄若虫中均有高表达。有趣的是,结合本实验室前期的绿盲蝽生物学结果(赵红霞等, 2011),这几个日龄正是处于绿盲蝽蜕皮时期,暗示 *AlPLC* 基因参与了绿盲蝽生长发育过程中的信号传导,且在绿盲蝽蜕皮变态时发挥着重要作用。前人研究表明,家蚕幼虫的蜕皮过程中,其体壁组织中的 PLC 活性处于峰值,说明体壁的真皮细胞不断接受到蜕皮激素的刺激,从而引起剧烈的细胞生理反应(徐亚玲等, 2014)。Liu 等人证实 PLC 是 JH (保幼激素)的膜受体,PLC 可诱导 *Met* 磷酸化从而提高其与 JH 的结合能力,从而激活转录活性,同时 JH 可激活 PLC-Ca 信号,而 PLC-Ca 信号通道也会调节 JH 下游基因的表达(Liu *et al*., 2015);此外,PLC 在棉铃虫幼虫表皮、中肠、脂肪体和血细胞中均表达,且在幼虫 5 龄蜕皮期和 6 龄变态期均有高表达特征,这些都暗示了 PLC 在昆虫蜕皮变态过程可能发挥一定的功能 (Liu *et al*., 2014a)。

本研究构建了 pCzn1-*AlPLC* 原核表达载体,测序及酶切结果表明原核表达载体构建成功。将构建好的重组载体转化到大肠杆菌中,用 IPTG 诱导后能够很好地表达重组 AlPLC 蛋白,主要以包涵体形式存在,这也暗示了 AlPLC 蛋白为一个膜蛋白。随后对诱导表达条件进行了优化,发现在 11℃ 0.5 mmol/L IPTG 诱导 12 h 后的条件下可大量表达 AlPLC 蛋白,为下一步的变性、复性、蛋白纯化以及之后抗体的制备的工作打下基础。

p-NPPC 是磷脂酰肌醇的结构类似物,PLC 可水解对硝基苯基磷酰胆碱产生对硝基苯酚。利用分光光度计测定反应前后吸光度的变化可测定出酶反应所产生的对硝基苯酚的量,故能用于对磷脂酶样品酶活性高低的定量检测。因其操作方便、可重复性强、反应时间短而得到广泛的应用,该法最早由 Kurioka 等人创立 (Kurioka and Matsuda, 1976; Wieland *et al*., 2002),目前对于磷脂酶 C 酶活性的研究主要集中在微生物领域,汪艳红(2014)以乙酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus*, 委内瑞拉链霉菌 *Streptomyces venezuelae* 及蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 这几种菌株的磷脂酶 C 为研究对象,实现其磷脂酶 C 基因在大肠杆菌中的重组表达并纯化,对其酶学性质和特异性分析比较,研究结果表明这几种菌株重组的 PLC 均可分解 *p*-NPPC,且重组酶活性的最适温度是 50 ~ 70℃,最适 pH 是 7.0 ~ 9.0。在本研究中,在获得绿盲蝽重组蛋白 AlPLC 的基础上,对其酶学性质进行了探究,结果表明 47 ~ 67℃ 时重组蛋白 AlPLC 都有较高的活性,57℃ 时酶活性达到最大;同时在碱性环境下,重组蛋白 AlPLC 都有较高的活性,在 pH 8.5 时活性达到最高,说明重组蛋白 AlPLC 是一个在碱性环境中具有较高酶活性的磷脂酶。

参考文献 (References)

Berridge MJ, 2009. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1793(6): 933 – 940.

Iga M, Iwami M, Sakurai S, 2007. Nongenomic action of an insect steroid hormone in steroid-induced programmed cell death. *Mol. Cell. Endocrinol*., 263(1 – 2): 18 – 28.

Janetopoulos C, Deverotes P, 2006. Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *J. Cell Biol*., 174: 485 – 490.

Kadamur G, Ross EM, 2013. Mammalian phospholipase C. *Ann. Rev. Physiol*., 75(1): 127 – 154.

Kocourková D, Krčková Z, Pejchar P, Veselková Š, Valentová O, Wimalasekera R, Scherer G, Martinec J, 2011. The phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C NPC4 plays a role in response of *Arabidopsis* roots to salt stress. *J. Exp. Bot*., 62 (11): 3753 – 3763.

Kurioka S, Matsuda M, 1976. Phospholipase C assay using p-nitrophenylphosphoryl-choline together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal. Biochem*., 75(1): 281 – 289.

Li WC, Xu YL, 2014. Progress in the study of the structure and function of phospholipase C reviewed. *Guangdong Silk*, 48(2): 25 – 28. [李文楚, 徐亚玲, 2014. 磷脂酶 C 的结构与功能研究进展. 广东蚕业, 48(2): 25 – 28]

Liu P, Peng HJ, Zhu J, 2015. Juvenile hormone-activated phospholipase C pathway enhances transcriptional activation by the methoprene-tolerant protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(15): 1871 – 1879.

Liu W, Cai MJ, Wang JX, Zhao XF, 2014a. In a nongenomic action, steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation of cyclin-dependent kinase 10 to promote gene transcription. *Endocrinology*, 155(5): 1738 – 1750.

Liu W, Cai MJ, Zheng CC, Wang JX, Zhao XF, 2014b. Phospholipase cγ1 connects the cell membrane pathway to the nuclear receptor pathway in insect steroid hormone signaling. *J. Biol. Chem*., 289 (19): 13026 – 13041.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle C_T}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Lu YH, Wu KM, 2008. Cotton Blind Bug and Its Control. Jindun Publishing House, Beijing. 29 – 31. [陆宴辉, 吴孔明, 2008. 棉花盲蝽象及其防治. 北京: 金盾出版社. 29 – 31]

Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Guo YY, Desneux N, 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487: 362 – 365.

Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Xia B, Li P, Feng HQ, Wyckhuys KAG, Guo YY, 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328: 1151 – 1154.

Manaboon M, Iga M, Iwami M, Sakurai S, 2009. Intracellular mobilization of Ca^{2+} by the insect steroid hormone 20-hydroxyecdysone during programmed cell death in silkworm anterior silk glands. *J. Insect Physiol.*, 55(2): 123 – 129.

Nishizuka Y, 1992. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082): 607 – 614.

Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler, K, Parker PJ, 2010. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(2): 103 – 112.

Rupwate SD, Rajasekharan R, 2012. Plant phosphoinositide-specific phospholipase C: an insight. *Plant Signal. Behav.*, 7(10): 1281 – 1283.

Wang YH, 2014. Cloning, Expression and Characterization of Phospholipase C Gene. MSc Thesis, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu. [汪艳红, 2014. 磷脂酶 C 的异源表达及其酶学性质分析. 江苏无锡: 江南大学硕士学位论文]

Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G, 2002. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect. Immun.*, 70(3): 1352 – 1358.

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676 – 1678.

Xu YL, Li WZ, Chen FY, Zhong YS, Wang YY, Lin JR, 2014. Variations of calcium and magnesium ion contents and phospholipase C activity in integument of molting *Bombyx mori* larvae. *Sci. Seric.*, 40(4): 666 – 671. [徐亚玲, 李文楚, 陈芳艳, 钟杨生, 王叶元, 林健荣, 2014. 家蚕幼虫蜕皮过程体壁组织中的钙镁离子含量和磷脂酶 C 活性的变化. 蚕业科学, 40(4): 666 – 671]

Zhao HX, Xiao LB, Tan YA , Wu GQ, Bai LX, 2011. Effects of different photoperiods on the life table parameters of *Apolygus lucorum*. *Cotton Sci.*, 23(2): 140 – 146. [赵洪霞, 肖留斌, 谭永安, 吴国强, 柏立新, 2011. 不同光周期对绿盲蝽实验种群生命表参数的影响. 棉花学报, 23(2): 140 – 146]

(责任编辑: 马丽萍)